Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert)

Produktion und Anreicherung eines löslichen Antigens aus Erysipelothrix insidiosa für diagnostische Zwecke

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereiches Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ulrike Royé geb. Bornefeld

aus Osterode/Ostpreußen

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Siegert)

Produktion und Anreicherung eines löslichen Antigens aus Erysipelothrix insidiosa für diagnostische Zwecke

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde
des Fachbereiches Humanmedizin
der
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ulrike Royé geb. Bornefeld
aus Osterode/Ostpreußen

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck: Erich Mauersberger, Marburg

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 29. Februar 1972

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Prodekane: Prof. Dr. med. G. Korb
Prof. Dr. med. W. Dölle

Referent: Doz. Dr. med. W. Mannheim

Correferent: Prof.Dr.med.Dr.med.dent.habil. H.Heuser

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. Einleitung	5
B. Materialien und Methoden	10
I. Mikroorganismen	10
II. Medien und Kultivierung	10
III. Präparation von Immunseren	12
a. Antigen	12
b. Immunisierung	12
c. Konservierung der Immunseren	12
IV. Herstellung der fixierten Erythrozyten und Prinzip der Sensibilisierung	12
V. Präparative Anreicherung des löslichen Antigens	16
a. Vakuumrotationsverfahren	16
b. Ammonsulfatfällung	16
c. Ultrafiltration	17
d. Sephadexgelchromatographie	17
e. Hämagglutinationshemmtest	17
C. Ergebnisse	19
I. Kulturell-biochemische Charakterisierung von E. insidiosa	19
II. Antikörpernachweis durch direkte Agglutination und Präzipitation	21
III. Antikörpernachweis durch indirekte Hämagglutination	21

a. Einfluß des pH auf die Sensibilisierung 21

b. Bestimmung der Antigengebrauchsverdünnung 23

IV. Antigenspezifität 23

V. Antigenproduktion in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium 24

VI. Anreicherungsgrad des Antigens 26

VII. Antikörpernachweis im menschlichen Serum 29

D. Besprechung 30

E. Zusammenfassung 33

F. Literatur 34

A. EINLEITUNG

Erysipelothrix insidiosa, zur Familie der Corynebakterien gehörig, zeigt in ihrer typischen Form schlanke, gerade, kleine bis mittelgroße 0,2 - 0,4 u grampositive Stäbchen, in Paaren und Ketten gelagert. Sie bildet keine Geißeln, keine Kapseln, keine Sporen. Für Warmblüter ist sie pathogen. Sie ist die Ursache des Schweinerotlaufs, ebenfalls von Infektionen bei Nerzen, Hasen, der braunen Ratte, Haus- und Wildvögeln (HAUPT 1964).

Der Rotlauf des Menschen ist zumeist als Berufskrankheit zu werten, da hauptsächlich Menschen befallen werden, die mit infektiösem Material rotlauferkrankter Schweine, bzw. mit davon hergestellten Nahrungsteilen in Berührung kommen (u.a. MOHR 1952).

Beim Menschen tritt neben dem Rosenbachschen Erysipeloid noch die Rotlaufseptikämie auf, die mit endocarditischen und arthritischen Beschwerden einhergeht, eine Erkrankung, welche sehr hartnäckig ist und zu Rezidiven neigt (LODENKÄMPER 1952).

Während ROSENBACH (1909) noch drei Erregerarten unterschied: 1. Erreger der Mäuseseptikämie (KOCH 1881), 2. Erreger des Schweinerotlaufs (LOEFFLER 1886), 3. Erysipeloid des Menschen (ROSENBACH 1887), bewies RICKMANN (1909) die Identität der drei Erreger, eine Auffassung, die auch heute noch ihre Gültigkeit hat.

Die Stämme wachsen in zwei Kolonieformen:
1. Glattkolonien (S-Kolonien), hauptsächlich aus dem Material septikämischer Infektionen, 2. Rauhkolonien (R-Kolonien), aus

dem Material chronischer Infektionen (HAUPT 1964). Nach WAWRZKIEWICZ (1964) existiert noch eine dritte, sogenannte X-Form, die aus einigen A- und B-Stämmen isoliert wurde.

An der Agaroberfläche stellt sich die Glattkolonie tautropfenähnlich, ganzrandig, rund, konvex und glänzend dar, während die Rauhkolonie in flaches körniges Aussehen zeigt, mit ausgefranstem Rand. Im Gelatineabstrich wächst die Glattform entlang dem Stich ohne Seitenäste, während die Rauhform büschelige Seitenäste bildet.

Was die serologischen Beziehungen der Stämme betrifft, so steht fest, daß sie keine Einheit bilden. Unterschieden werden die drei Typen: A, B und N. Der Unterschied ist, wie GLEDHILL (1945) bestätigte, durch thermostabile Antigene bedingt - nach GRALHEER (1951) handelt es sich hier um Polysaccharide -, die durch thermolabile, typenspezifische Proteinfraktionen überlagert werden. Neben diesen thermostabilen, säurelöslichen Fraktionen fanden TRAUB (1947) und GLEDHILL (1947) ein in das Kulturmedium übergehendes thermolabiles Hüllantigen, welches sich für die aktive Immunisierung bei Mäusen und Schweinen als ausschlaggebend erwies.

HAUSMANN (1951) wies auf die Nährbodenabhängigkeit seiner Bildung hin. GLEDHILL (1952) zeigt seine Analogie mit den "L"-Antigen, einem Antigen, welches er an der Zelloberfläche bei Medien fand, in denen Serum enthalten war (GELDHILL 1947).

DINTER zeigte 1948, daß einzelne Stämme von Erysipelothrix insidiosa Hühnererythrozyten zu agglutinieren vermögen und daß diese Fähigkeit durch homologe Seren in spezifischer Weise aufgehoben wird.

Die Bildung von Hämagglutinin durch dem Typ A zugehörige Stämme wird nach DEDIE (1950) durch Zusatz von Pferdeserum zum Nährboden wesentlich gefördert, während B-Stämme hiervon unabhängig sind. Typenspezifische Seren konnte DEDIE (1951) nur mit Keimen herstellen, bei denen die Eiweißfraktionen durch Erhitzen denaturiert worden waren.

Nach DEDIE (1949) und GRALHEER (1951) untersuchten BRILL, MIKULASZEK und TRUSZCZYNSKI (1959) die Antigenstruktur des Rotlaufstäbchens mit Hilfe immunochemischer Technik. Hierbei stellten sie fest, daß der Wandaufbau des Rotlaufstäbchens zwei Polysaccharidhaptene mit verschiedenem chemischen Aufbau und verschiedener serologischer Spezifität enthält, von denen eines einen Eiweißpolysaccharidkomplex bildet und in erster Linie die Typenspezifität des Rotlaufbakteriums bildet. Dieses erste Hapten gewannen sie nach Abzentrifugieren und anschließender Ausfällung mit Aethanol aus dem Flüssigkeitsüberstand.

Das zweite Polysaccharid, welches aus dem Bodensatz ebenfalls durch Aethanolfällung gewonnen wurde, besitzt eine einfachere Struktur. Es enthält nur Galaktose. Aus der Bakterienwand wird es durch Alkaliwirkung freigesetzt. Über die Spezifität wird nichts ausgesagt.

Mit Hilfe der Immunoelektrophorese und der Diffusionspräzipitation in Agargel untersuchte NIKOLOV (1962) das elektrophoretische Verhalten des Antigens, indem er Extrakte der untersuchten Stämme mit Ultraschall behandelte und mehrere Tage bei -4°C extrahierte.

Ebenfalls durch Elektrophorese in Agargel wie TRUSZCZYNSKI

(1964) drei Proteinfraktionen in wäßrigem Extrakt nach, zwei Fraktionen in Polysaccharid-Protein-Lipid-Komplexen, isoelektrischen Nukleoproteinen, in Lipopolysacchariden und Proteinen der Serotypen **A**, B und eines Stammes der Gruppe N.

Durch Chromatographie mit DEAE Zellulose und anschließender Reinigung durch Acetonfraktionierung von Acetonpuder von E. insidiosa Typ A, und Dialyse, konnten KALF und **WHITE** (1961) aus Rotlaufbakterien ein typspezifisches Antigen (A-Antigen) nachweisen, welches in seiner chemischen Zusammensetzung ein Mucopeptid darstellte.

KALF (1963,1964) untersuchte weitere typenspezifische Antigene mit ähnlichen Methoden und erhielt eine chemische und serologische Identität mit dem A-Antigen.

ERLER (1966) untersuchte ein typenspezifisches Hapten mit DEAE-Sephadex A 25 und anschließender Gelfiltration an Sephadex G 100. Analysen ließen eine Konzentration insbesondere der Aminozucker erkennen (52% gegenüber einem Mittelwert von 18%). Daneben ging eine Erhöhung der serologischen Aktivität parallel (Präzipitation auf 1:100 000).

PARNAS (1966) stellte Untersuchungen über die Zuckerbausteine bei Zellwandantigenen an und konnte folgende Zucker bei allen drei serologischen Typen nachweisen: Glucuronsäure, Galacturonsäure, Glukosamin, Galaktose, Glukose, Ribose, Rhamnose. Alle Serotypen gehörten dem gleichen Chemotyp an.

Anlaß der vorliegenden Untersuchungen war das Fehlen einer Routinemethode des Antikörpernachweises bei Verdacht auf

menschliche Erkrankung durch Erysipelothrix, insbesondere bei generalisierten Erysipelothrix-Infektionen, bei fehlendem kulturellen Erregernachweis.

Es wurde geprüft, ob eine speziesspezifische Antigenkomponente von E. insidiosa zum Antikörpernachweis verwendet werden kann.

B. MATERIALIEN UND METHODEN

I. Mikroorganismen

Getestet wurden die drei serologischen Typen von E. insidiosa A, B und N. Die folgenden Stämme standen zur Verfügung:

Serologischer Typ A, Nr. 796,
Behringwerke Marburg.
Serologischer Typ B, Nr. 175,
Behringwerke Marburg.
Serologischer Typ N, Stamm "Frankfurt",
Behringwerke Marburg.

II. Medien und Kultivierung

Folgende Medien wurden verwendet:

a. Proteose-Pepton-Glucose

Proteose pepton No 3 (DIFCO)	2 %
NaCl	0,6 %
Glucose	0,5 %
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	q.s. pH 7,6

b. Trypticase-Soy-Broth (Baltimore Biological Laboratory)

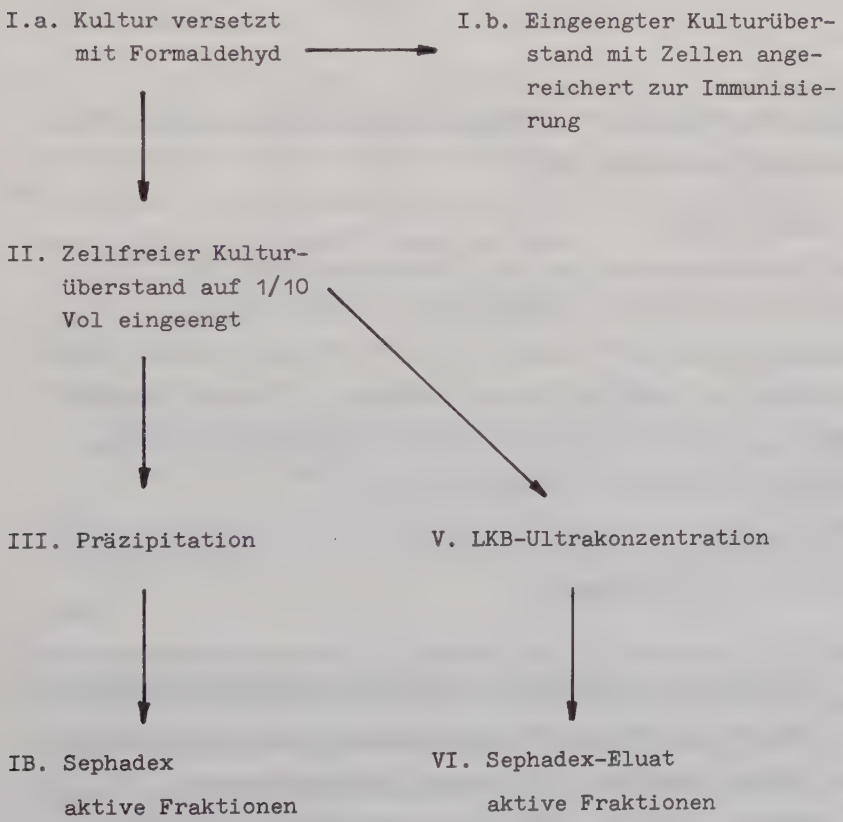
Kulturverfahren:

Diese Medien wurden in Steilbrustkolben (Schott 20 451) im Volumenverhältnis von ca. 0,05 % V/V mit 30 Stunden bei 37°C bebrüteten Thioglykolatkulturen beimpft. Die Kulturen wurden ca. 24 Stunden bei 37° C stehend bebrütet und, nach Entnahme der Reinheitskontrollen, mit 0,5 % Formalin versetzt, über

Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

Die Wachstumsdichte der Kultur wurde beurteilt anhand der Transmission bei 578 nm im Photometer Eppendorf gegen das unbeimpfte Medium.

Abb. 1: Schema des Präparationsganges



III. Präparation von Immunseren

a. Antigenherstellung:

Bewachsene Kulturen wurden mit Formalin 0,5 Gew% inaktiviert und 60 Minuten lang bei 4° C im MSE-Winkelrotor zentrifugiert. Als Antigen diente eine Suspension des Sediments von ca. 150ml bewachsener Kultur in 60 ml zellfreiem Kulturüberstand, der im Rotationsverdampfer bei 40° C und mit Silikon-Antischaumemulsion 1:300 versetzt, auf 1/10 des Ausgangsvolumens eingeengt worden war.

Das "Antigen" des A-Stammes war aus Kulturen in Proteose-pepton Medien, das "Antigen" der übrigen Stämme aus Kulturen in Trypticase-Soy-Broth hergestellt.

b. Immunisierung

Drei Kaninchen wurden mit steigenden Dosen von 0,5 ml, 1 ml, 2 ml, 4 ml und 5 ml in Abständen von 3 bis 4 Tagen und einer Gesamtdauer von ca. 3 Wochen bis zur Entblutung beimpft, wobei das Kaninchen, dem Typ B injiziert wurde, so starke Schmerzreaktionen zeigte, daß es nur nach vorhergehender Nembutalinjektion von 1 ml zu immunisieren war.

c. Die Immunseren wurden im Verhältnis 1 : 1 glyzerinisiert und bei + 4° C aufbewahrt.

IV. Fixierung der Erythrozyten und Prinzip der Sensibilisierung

Die Präparation der in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Schaferythrozyten erfolgte auf folgende Weise:

a. Frisches Schafblut wurde zu gleichen Teilen mit Alsever-Lösung versetzt, in sterile Röhrchen abgefüllt und bis zur

Fixierung bei + 4° C gelagert.

Zusammensetzung der Alsever-Lösung (SCHMIDT 1959):

Trinatriumcitrat		4,00 g
Zitronensäure		0,25 g
Glucose (wasserfrei)		9,33 g
Natriumchlorid		2,09 g
Aqua dest.	ad	500 ml

20 min autoklaviert (120° C, 1 Atm.)

b. Die Fixierung der Erythrozyten erfolgte nach der von MALONEY und KAUFFMANN (1960) angegebenen und bei ihnen für Toxoplasmaantikörper verwendeten Methode, die sich auch bei diesen Untersuchungen erfolgreich verwenden ließ.

Die in Alsever-Lösung steril aufbewahrten Schaferythrozyten werden dreimal mit dem doppelten Volumen gepufferter 0,85 % Kochsalzlösung, pH 7,2, gewaschen, anschließend zu 12,5 % in der gleichen gepufferten Kochsalzlösung suspendiert. In einen Dialysierschlauch bringt man 25 ml der Fixierlösung (s.unten) und gibt diese zu der Erythrozytensuspension, um eine langsame Durchsetzung der Suspension mit der Fixierlösung zu erreichen.

Die Erythrozytensuspension mit dem Dialysierschlauch hält man 24 Stunden bei Zimmertemperatur in einer Rolltrommel oder im Schüttelapparat in leichter Bewegung. Anschließend wird der Inhalt des Dialysierschlauches in die Erythrozytensuspension entleert. Man läßt die Suspension weitere zwei Tage bei Zimmertemperatur im Schüttelapparat, zentrifugiert die Erythro-

zyten bei 2000g ab und wäscht sie 5 x mit dem gleichen Volumen gepufferter Kochsalzlösung pH 7,2.

Zusammensetzung der Fixierlösung (PARK 1960):

Formaldehyd (38 Vol %)		200 ml
Äthylalkohol abs.		50 ml
$NaH_2PO_4 x\ H_2O$		4,00 g
$Na_2HPO_4 x\ 12H_2O$		16,13 g
Aqua dest.	ad	100 ml

Zusammensetzung der gepufferten Kochsalzlösung (pH 7,2):

KH_2PO_4, m/5		9,3 ml
Na_2HPO_4 , m/5		24,0 ml
NaCl		8,5 g
Aqua dest.	ad	1000 ml

c. Die so fixierten Erythrozyten werden in gepufferter NaCl-lösung pH 7,2 1:5 verdünnt und können mit einem Zusatz von Merthiolat 1:10 000 bei + 4° C länger als acht Monate aufbewahrt werden.

Durchführung des Hämagglutinationstestes:
Die Ausführung des Hämagglutinationstestes folgt der nach BOYDEN (1951) angegebenen Technik unter Verwendung tanninbehandelter Schaferythrozyten, die nach dem beschriebenen Verfahren vor der Tanninbehandlung fixiert worden waren. Es ergaben sich folgende Schritte:

a. Bei + 4° C gelagerte und fixierte Schaferythrozyten werden 2 x mit dem gleichen Volumen gepufferter NaCl pH 7,2

gewaschen. Es wird eine 2,5 % Suspension in gepufferter NaCl pH 7,2 hergestellt.

b. Vor jedem Test stellt man sich aus einer 1 % Tanninstammlösung (1 % Tannin in 0,15 ml NaCl), die bei 4° C gelagert wurde, eine Tanninstammlösung 1:20 000 in 0,85 % NaCl her. Zu einem Volumen Tannin (1:20 000) gaben wir das gleiche Volumen Erythrozytensuspension hinzu. Das Gemisch blieb 30 Minuten bei 37° C im Wasserbad. Dann zentrifugierten wir die Erythrozyten, wuschen einmal mit 2 Volumen gepufferter Kochsalzlösung (10 Minuten bei 2000 g) und resuspendierten die Blutkörperchen zu 2,5 % in gepufferter Kochsalzlösung (pH 7,2).

c. Die tannierten Erythrozyten wurden jetzt mit der ermittelten Antigen-Gebrauchsverdünnung sensibilisiert. Zu einem Volumen tannierter Erythrozyten kamen 4 Volumen einer gepufferten Kochsalzlösung (pH 5,2) und ein Volumen Antigen. Diese Mischung blieb 15 Minuten bei 37° C im Wasserbad. Nach dem Abzentrifugieren und zweimaligem Waschen mit einer Lösung 2 % Kaninchennormalserums in gepufferter NaCl (pH 7,2) erfolgte eine Aufschwemmung der sensibilisierten Erythrozyten in 2 % Kaninchennormalserum zu 2,5 %. Die sensibilisierten Erythrozyten können zwei Tage ohne Aktivitätsverlust bei 4° C gelagert werden.

d. Die zu untersuchenden Immunseren wurden, bevor die sensibilisierten Erythrozyten hinzugegeben werden konnten, 20 Minuten bei 60° C inaktiviert, dann mit frischen, gew aschenen und gepackten Schaferythrozyten absorbiert, um eventuell vorhandene heterogene Antikörper gegen Schaferythrozyten zu binden, in 2 % Kaninchennormalserum 1:2 verdünnt und auf Hämagglutinationsplatten (Prestware Ltd., London, mit 80 kalot-

tenförmigen Vertiefungen von 16x11 mm) Verdünnungsreihen in 2 % Kaninchennormalserum pipettiert.

Nach dem Zutropfen der sensibilisierten Erythrozyten wird die Platte in eine feuchte Kammer gestellt. Man läßt die Platten bei Zimmertemperatur stehen. Nach 8 bis 12 Stunden wird der Endtiter bestimmt. Die Ablesung erfolgt nach der Sedimentationsfigur. Als positiv gilt deutliche Ringbildung bzw. eckige Ausziehung. Als negativ gilt eindeutige Knopfbildung am Boden der Plattenvertiefung.

Zu jedem Test waren folgende Kontrollen notwendig:

1. Tannierte Erythrozyten im Puffer
2. Tannierte Erythrozyten im Serum
3. Sensibilisierte Erythrozyten im Puffer

Der Test ist nur bei negativem Ausfall der Kontrollen verwendbar. Dieser Test konnte auch mit frischen Erythrozyten durchgeführt werden.

V. Präparative Anreicherung des löslichen Antigens

a. Vakuumrotationsverfahren

Um das Antigen zu konzentrieren, engten wir den Rohextrakt im Rotationsverdampfer bei 40° C auf etwa 1/10 seines Volumens ein. Da ein starker Schäumungseffekt der Kulturflüssigkeit zu beobachten war, mußte Silikon-Antischaumemulsion 1:300 zugesetzt werden.

b. Ammonsulfatfällung

Eine Salzfällung wurde mit Ammonsulfat vorgenommen. Die Lösungen, in kleinen Röhrchen angesetzt, waren zu 10 %, 30 %, 50 % und 66 % gesättigt.

c. Ultrafiltration

Das so konzentrierte Antigen engten wir darauf im LKB-Ultrafilter ein. Bei einer Temperatur von 4° C, mehrmaliger Waschung mit Aqua dest. und nach ca. 12stündiger erneuter Evakuierung an der Wasserstrahlpumpe ließen wir das Antigen 3 Tage filtern, um dann die Aktivität des Präzipitinogens durch eine Verdünnungsreihe und einen indirekten Hämagglutinationstest im Filtrat und im Konzentrat zu prüfen.

d. Sephadexgelchromatographie

Die Präparation der Sephadex-Säule wurde folgendermaßen vorgenommen:

Die Vorbehandlung des Sephadex richtet sich nach der Partikelgröße des Gels. Sephadex G 100, in Aqua dest. suspendiert, muß drei Tage ausquellen, um seine vollständige Hydratisation zu erlangen (DETERMANN 1967). Das gleiche Ergebnis ist mit 5-stündiger Erhitzung im Wasserbad bei 100° C zu erzielen. Danach erfolgt eine Evakuierung an der Wasserstrahlpumpe, um die eventuell eingeschlossene Luft zu entfernen.

Die Säule selbst wurde mit Dimethyl-Chlorosilan silikonisiert und konnte dann gepackt werden. Das unten verschlossene Glasrohr versahen wir mit einem kleinen Bausch Glaswolle. Darüber kam eine einige Millimeter hohe Schicht aus Glasperlen. Das gequollene Gel wurde unter ständigem Rühren eingefüllt, anschließend mit Pufferlösung (Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7,2) mindestens ein Säulenvolumen durchgespült. Die an ein Kälteaggregat angeschlossene Säule zeigte eine Temperatur von +4°C.

e. Hämagglutinationshemmtest

Zur Durchführung des Hämagglutinationshemmtests ermittelt man

nach BECKMANN, LÜDERITZ und WESTPHAL (1964) zunächst die geeigneten quantitativen Verhältnisse des konstant zu haltenden hämagglutinierenden Systems.

Von der Hemmstofflösung wird eine Verdünnungsreihe (1:2) mit 0,9 % NaCl-Lösung hergestellt. 0,2 ml jeder Hemmstofflösung werden mit 0,2 ml der zuvor ermittelten Serumverdünnung versetzt, und nach gutem Durchschütteln 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend fügten wir 0,2 ml sensibilisierte Erythrozyten hinzu (1:200) und inkubierten nochmals 30 Minuten bei 37° C. Zu ermitteln war eine noch eben vollständig gehemmte Hämagglutination.

C. ERGEBNISSE

I. Kulturell-biochemische Charakterisierung von E. insidiosa

Um eine bakteriologische Rotlaufdiagnose zu stellen, bietet sich unter anderem das kulturelle und biochemische Verhalten an. Die Stämme Nr. 796 (Typ A), Nr. 175 (Typ B) und "Frankfurt" (Typ N), die auf Blutagar ausgestrichen wurden und bei Temperaturen von 20° C, 37° C und 45° C 24 Stunden bebrütet wurden, zeigten bei 20° C kaum Kolonien, bei 37° C waren kleine graue Kolonien gewachsen , die ganzrandig waren und eine glatte Oberfläche aufwiesen. Bei 45° C war ebenfalls nichts gewachsen. Auf entsprechend angefertigten Clauberg-Agarkulturen war überhaupt kein Wachstum der Stämme zu beobachten.

Untersuchungen zum Nachweis der Schwefelwasserstoffbildung der Rotlaufbakterien mittels des Kliglerschen Eisenagars und der Thioglycolatkulturen mit anaerobem Wachstum zeigten bei Prüfung mit Bleiacetatpapier eine deutliche H_2S-Bildung. Darüber hinaus konnte im Kliglerschen Stichagar noch Säurebildung nachgewiesen werden.

Beweglichkeit wurde in 24 Stunden bei Zimmertemperatur bebrüteten Trypsinbouillonkulturen geprüft. Im hängenden Tropfen war keine Beweglichkeit festzustellen.

Die Ergebnisse der Säurebildung aus Kohlenhydraten mittels Pepton-Bromthymolblaumedien (KAUFFMANN 1954), denen zur Initiation des Wachstums Achromobacter metalcaligenes zugesetzt war (MANNHEIM 1962), zeigt Tabelle 1.

Der pH-Umschlag erfolgte sehr zögernd, nach etwa einer Woche.

Tabelle 1

	Arabinose	Fructose	Xylose	Galactose	Glucose	Mannose	Lactose	Maltose	Trehalose	Raffinose	Cellobiose	Inosit	Mannit	Sorbit	Inulin	Salicin
	Säurebildung															
E.insidiosa Typ A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
E.insidiosa Typ B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
E.insidiosa Typ N	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-

Zeichenerklärung: + = positiver Reaktionsausfall

- = negativer Reaktionsausfall

Es konnte keine Äskulin-Spaltung, keine Urease, keine Katalase nachgewiesen werden.

Beim Vergleich der Medien Leberbouillon, Trypticase-Soy-Broth, Glucose-Bouillon, Proteose-Pepton-Glucose wiesen Trypticase-Soy-Broth und Proteose-Pepton-Glucose gleiche Bewachsungsdichte auf und erschienen für die weiteren Versuche geeignet.

II. Antikörpernachweis durch direkte Präzipitation

Von der im Rotationsverdampfer auf 1/10 Volumen eingeengten, formalisierten Proteose-Pepton-Glucose Kultur von E.insidiosa, Typ A, die im MSE-Winkelrotor abzentrifugiert wurde und deren Überstand im LKB-Filter gereinigt worden war, fertigten wir sowohl vom Ultrakonzentrat als auch vom Ultrafiltrat Verdünnungsreihen an (Widal-Reaktion) mit in NaCl 1:30 verdünntem Patientenserum und erhielten, nachdem die Verdünnungsreihen 5 Stunden bei 50° C im Wasserbad inkubiert worden waren, folgende Präzipitationstiter:

LKB-Konzentrat	1:16
LKB-Filtrat	1:4

Ein entsprechendes Präparat aus Trypticase-Soy-Broth Kulturen zeigte gleiche Ergebnisse.

III. Antikörpernachweis durch indirekte Hämagglutination

a. Vorversuche:

Tannierte Erythrozyten, in Phosphat-Pufferlösungen nach Sörensen suspendiert, deren pH-Wert zwischen 3 und 8 abgestuft war, verhielten sich bei Spontanagglutination wie in Tabelle 2 angegeben:

Tabelle 2

Effekt des pH auf die Spontanagglutination:

Sörensenpuffer pH	Titer
3	1:2042
3,6	1: 512
5,2	1: 64
6	1: 16
7	1: 8
8	1: 64

Daß die Bindung von Antigen an die Erythrozytenoberfläche ebenfalls vom pH abhängig ist, zeigten unsere weiteren Versuche. Wurde die Sensibilisierung in Sörensen-Phosphatpuffer durchgeführt, dessen pH-Wert ebenfalls zwischen 3 und 8 abgestuft war, so traten auch hier Titerunterschiede von mehreren Verdünnungsstufen auf. Der höchste Titer fand sich bei pH 5,2 der sensibilisierten Erythrozytencharge. Dieser pH-Wert wurde deshalb zur Sensibilisierung bei den weiteren Untersuchungen benutzt (s. Tabelle 3).

Tabelle 3

Effekt des pH auf die Sensibilisierung

Sörensen-Phosphat-puffer pH	Titer
2	1: 64
3	1: 64
3,6	1:250
5,2	1:512
6	1:128
7	1: 64
8	1: 64

b. Die Bestimmung der Antigengebrauchsverdünnung wurde ebenfalls mit Hilfe des HAT durchgeführt. Die folgende Tabelle 4 zeigt die Titerhöhe eines positiven Serums in Abhängigkeit von der Antigengebrauchsverdünnung.

Tabelle 4

Beispiel eines Vorversuches zur Ermittlung der Antigengebrauchsverdünnung für die IHR:

Antigen-verdünnung	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4100	Titer
unverdünnt	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:4100
1/2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1:4100
1/4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	1:1024
1/8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	1: 512
1/16	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1: 256
1/32	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1: 128

Bei einer Verdünnung von 1/2 war der gleiche Titer abzulesen wie beim unverdünnten Antigen. Sie diente als Gebrauchsverdünnung für weitere Versuche.

IV. Antigenspezifität

Die Antiseren gegen Typ A, B und N wurden in der IHR mit den nativen Kulturüberständen der drei Stämme ausgetestet, wobei sich das folgende Ergebnis zeigte (Tabelle 5):

Tabelle 5

	Serum Anti A	Serum Anti B	Serum Anti N
Antigen A	1:1000	1:1000	1:1000
Antigen B	1:2000	1:1000	1:4000
Antigen N	1: 128	1:1000	1: 500

Die spezifische Präzipitation konnte mit dem Agardoppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY nachgewiesen werden. Bei dem Antigen vom Typ A, welches im Rotationsverdampfer bei 40° C, im LKB-Ultrafilter und mit Hilfe der Säulenchromatographie auf Sephadex G 100, anschließender Dialyse konzentriert und gereinigt worden war und bei 4° C auf Ion-Agar gegen die drei Antiseren A, B und N diffundierte, zeigten sich nach vier Tagen auf einer Platte mit einem Lochabstand von jeweils 1 cm eine zarte Präzipitationslinie zum Antiserum N. Auf einer anderen Platte etwas härtere Präzipitationslinien zu den Antiseren N und B.

Das Antigen A reagierte also nicht oder nur schwach mit dem homologen Antiserum. Auch beim Austesten der Antigene gegen die agglutinierenden Antikörper fanden sich nicht die höchsten Titer im homologen Antigen-Antikörper-System, wie Tabelle 5 zeigt.

Es ist anzunehmen, daß die Lösungen mehrere korrespondierende Antigen-Antikörper-Systeme enthalten, daß das Antigen also nicht typenspezifisch, sondern spezies-spezifisch reagiert.

V. Antigenproduktion in Abhängigkeit vom Wachstumsstadium

Trypticase-Soy-Broth aus der gleichen Vorkultur mit 2 % des Volumens der Typen B und N beimpft und statisch bei 37° C bebrütet, zeigte nach 6, 12, 18 und 24 Stunden die in Tabelle 6 angegebenen Trübungswerte, die bei 578 nm gegen unbeimpftes Medium im Photometer Eppendorf gemessen wurden. Nach der Zentrifugation im MSE-Winkelrotor bestimmten wir die Titer des

Kulturüberstandes mit Hilfe des indirekten Hämagglutinationstestes.

Die Tabelle 6 zeigt die Abhängigkeit der Antigenproduktion von der Wachstumsphase der Kultur. Nach ca. 24 Stunden war in allen Fällen ein Maximum an löslichem Antigen im Kulturüberstand vorhanden.

Tabelle 6

Wachstum und Auftreten von Antigen im Kulturüberstand von E. insidiosa:

Bebrütungsdauer	Trübung 578 nm	IHT-Titer
6 h	E 0,045	B-Serum 1: 8 N-Serum 1: 512
12 h	E 0,144	B-Serum 1: 512 N-Serum 1:1024
18 h	E 0,155	B-Serum 1: 128 N-Serum 1:2048
24 h	E 0,168	B-Serum 1:2048 N-Serum 1:5096 A-Serum 1:5096
48 h	E 0,225	A-Serum 1:2048
72 h	E 0,236	A-Serum 1:2048
96 h	E 0,245	A-Serum 1:2048

Zeichenerklärung: h = Stunden
E = Extinktion

Die Antigenproduktion läuft also parallel der Trübung.

VI. Anreicherungsgrad des Antigens

Ein vorweggenommener Hitzeempfindlichkeitstest ergab eine Hitzelabilität des löslichen Antigens. Von 60° C an nahm die Aktivität ab. Das bei 120° C im Autoklaven behandelte Antigen zeigte schließlich keinerlei Aktivität mehr (s. Tabelle 7).

Tabelle 7

Inaktivierung des löslichen Antigens durch Erhitzung von einer Stunde

	IHT-Titer
60°C	1:256
80°C	1:128
100°C	1:128
120°C	-

Nachdem das Antigen im Rotationsverdampfer bei 40°C auf etwa 1/10 seines Volumens eingeengt war, ohne daß es etwas von seiner Aktivität einbüßte, ergab die Salzfällung mit Ammonsulfat einen quantitativen Ausfall dieses Antigens bei 2/3 gesättigter Lösung. Nach Säurefällung mit 96 % Essigsäure war hingegen im Präzipitat keine Antigenaktivität nachweisbar.
Eine weitere Anreicherung lieferte die Ultrafiltration (LKB-Ultrafilter). Eine angefertigte Verdünnungsreihe sowie ein indirekter Hämagglutinationstest des Filtrats und des Konzentrats zeigten, daß die Aktivität des Erysipelothrix-Präzipitinogens im Konzentrat angereichert wurde. Das Präzipitinogen wanderte nicht durch den Filter, seine Molekülgröße ist also höher als 30 000. Vergleichende Werte ergeben eine höhere Testempfindlichkeit des IHT (s. Tabelle 8).

Tabelle 8

	Titer des Filtrats	Titer des Konzentrats
Direkte Präzipitation	1 : 4	1 : 16
IHT	1 : 32	1 : 256

Eine etwas präzisere Angabe über die Molekülgröße lieferte die Gelchromatographie auf Sephadex G 100 anhand des Durchflusses von Markern. Eichläufe der Säulen zeigten folgende Ergebnisse (s. Tabelle 9):

Tabelle 9

Marker-Substanz	Mol.Gew.	Fraktion des Eluats (ml)
Dextran blau (1 ml in aq. dest. gelöst)	2 000 000	90 ml
Eialbumin aus Hühnerei 1 x krist.	45 000	140 ml
Cytochrom C salzfrei 0,43% Fe aus Pferdeherz	13 ooo	190 ml

Nach Hinzufügung von 1 ml unseres wie oben beschriebenen konzentrierten Antigens ergab sich durch die Austestung der Fraktionen im IHT, daß das Maximum an Aktivität bei etwa 130 ml (Mittelwert) lag und die Molekülgröße zwischen 45 000 und 2 000 000 liegt.

Mit dem so angereicherten und gereinigten Antigen konnte im

Hämagglutinationshemmtest zunächst die minimale Hämagglutinationskonzentration ermittelt werden.

Bei der Antigenverdünnung 1/8 und den Serumverdünnungen 1:64 und 1:124 zeigte sich der minimale Hämagglutinationstiter. Wir führten deshalb den Hemmtest nach dem Verfahren von BECKMANN (1964) mit diesen Verdünnungen und folgenden Zuckern durch:

1. Asparagin	pH 6,4
2. Glutaminsäure	pH 5,4
3. meso-Inosit	pH 6,7
4. Alanin	pH 6,7
5. Rhamnose	pH 6,7
6. Malonsäure	pH 5,4
7. Galactose	pH 6,4
8. Fructose	pH 6,4
9. Glucosamin	pH 6,7
10.Sorbit	pH 6,7
11.N-Acetyl-Glucosamin	pH 6,4
12.Glucuronsäure	pH 5,4
13.Galacturonsäure	pH 5,4

Im Gegensatz zu TRUSZCZYNSKI (1964), bei dessen Untersuchungen eine Hemmung durch Galactose erzielt werden konnte, mußten wir bei unseren Untersuchungen ein negatives Ergebnis verzeichnen. Weder hemmte Galactose noch ein anderer untersuchter Zucker, auch nicht, als bei einer Variation des Testes nach Vorinkubation die Serumverdünnungen bei Zimmertemperatur über Nacht standen und dann erst die Erythrozyten zugegeben wurden.

VII. Antikörpernachweis im menschlichen Serum

Mit Hilfe des Serums eines an einer Allgemeininfektion von generalisiertem Erysipeloid erkrankten Patienten konnten Antikörper im menschlichen Serum nachgewiesen werden. Zum Vergleich fertigten wir neben dem indirekten Hämagglutinationstest eine Verdünnungsreihe nach WIDAL an, um zu sehen, ob für diagnostische Zwecke ein eindeutiger Titernachweis im IHT-Test erbracht werden kann (Tabelle 10).

Tabelle 10

	Typ A	Typ B	Typ N
IHT-Test Titer	1: 256	1: 512	1:1024
WIDAL-Test Titer	1:1280	1:1280	1: 640

Im indirekten Hämagglutinationstest zeigte sich lediglich ein höherer Antikörpertiter im serologischen Typ N.
Der indirekte Hämagglutinationstest ergab nicht das erwünschte eindeutige Ergebnis. Vergleiche mit Humanseren anderer Patienten wären erforderlich.
Die Schwierigkeit dieses Unternehmens bestände in der Beschaffung der hierzu notwendigen Vielzahl verschiedener Seren, da der Pathogenität des Rotlaufbakteriums für den Menschen zu wenig Bedeutung beigemessen wird (EWALD 1964).

D. BESPRECHUNG

In der klinischen Diagnose von Erysipeloid haben serologische Verfahren, die bei chronisch verlaufenden Infektionen des Tieres verschiedentlich erfolgreich waren, beim Menschen bisher keine Bedeutung erlangt.
Auch die vorliegende Untersuchung kann nur in bedingtem Umfang weiterhelfen, da zwei Voraussetzungen für die Routineanwendung der Methode nicht erfüllt werden konnten:

1. Eine epidemiologisch-statistische Überprüfung
2. Der Vergleich mit den Antigenen anderer grampositiver Keimgruppen, wie zum Beispiel Listerien, Corynebakterien, Streptokokken und Laktobakterien

Analog mit dem hier verwendeten und untersuchten löslichen Antigen war ein von GLEDHILL (1952) beschriebenes thermolabiles, lösliches Antigen in zellfreiem Überstand, welches beim Kaninchen Antikörper erzeugte. Nach Ausfällung mit Aluminiumhydroxyd erbrachten diese löslichen Antigene gute Impfstoffe, die aber nur im Tierversuch erprobt wurden. Seine These, daß Zellen hochwirksame Impfstoffe erbringen, wenn sie einen großen Anteil dieses Antigens erzeugt und gespeichert haben, müßte noch überprüft werden.
Mit der hier beschriebenen Methode der Anreicherung des Antigens konnten nur schwache Ergebnisse erzielt werden. Trotz Einengung des Rohextraktes im Rotationsverdampfer, anschließender Ammonsulfatfällung, Reinigung durch den Ultrafilter und darauf folgender Sephadexgelchromatographie konnte das

Antigen nicht so konzentriert werden, daß eine Immunelektrophorese mit eindeutigem Ergebnis möglich gewesen wäre.
Auch der Ouchterlony-Test zeigte nur schwache Präzipitationslinien, so daß eine photographische Dokumentation nicht möglich war. Während bei ERLER (1966), der ein typspezifisches Antigen durch Gelfiltration und Polystyrolaustauscher 5 BW konzentrierte, eine eindeutige Erhöhung der serologischen Aktivitäten zu verzeichnen war, blieben unsere Titer, abgesehen von geringen Erhöhungen, fast immer gleich.
Auch andere Autoren (NIKOLOV 1962, KALF 1963, 1964, TRUSZCZYNSKI 1961) gewannen mit Acetonpuderfällung, Salzsäurefällung DEDIE 1949, GRALHEER 1951), Chromatographie auf DEAE-Cellulose und Sephadex einen höheren Anreicherungsgrad als bei der in dieser Arbeit beschriebenen Methode. Eindeutige Reinigungsversuche konnten aber, wie auch ERLER (1966) schreibt, von diesen Autoren bisher nicht nachgewiesen werden.
Verschieden sind die Angaben über die Spezifität des Antigens. In den vorliegenden Untersuchungen zur Bestimmung der Antigenspezifität hatte man keine Anhaltspunkte zum Nachweis einer Typspezifität. Sowohl der IHT-Test, der die drei serologischen Typen der Antigene gegen die drei Antisera austestete, als auch der Agardoppeldiffusionstest nach OUCHTERLONY zeigten, daß das untersuchte Antigen spezies-spezifisch reagierte.

Während NIKOLOV (1962) auch nur artspezifische Antigene nachwies, gelang es mit Hilfe von Säurefällung bzw. Acetonpuderextraktion KALF (1963, 1964) und TRUSZCZYNSKI (1961) typenspezifische Antigene zu ermitteln. In Bouillonkulturen konnte TRUSZCZYNSKI (1963) ebenfalls nur spezies-spezifische Antigene

nachweisen. Die Frage nach der Spezifität bleibt weiterhin offen.

Auch hier müßte man einen Vergleich mit Antigenen anderer grampositiver Keimgruppen heranziehen.

Man kann auf Grund der vorliegenden Untersuchungen die positive Aussage machen, daß Erysipelothrix-Infektionen mit der Bildung von Antikörpern einhergehen, die gegen das typenunspezifische lösliche Antigen von Erysipelothrix insidiosa gerichtet sind. Es sind Infektionen durch andere Keime möglich, obgleich keine Anhaltspunkte dafür bestehen. Hierbei ist besonders an Mischinfektionen zu denken, aber auch an Corynebakterien, die für den Menschen fakultativ pathogen gelten und zu Entzündungserregern werden können.

Auch die für den Menschen als apathogen beschriebenen Laktobakterien können sowohl zu Gelenkaffektionen und zu einer subakuten bakteriellen Endocarditis führen (EWALD 1964).

Ebenso muß eine Listerien-Infektion in Erwägung gezogen werden, die leicht zu Verwechslungen mit septikämischem Rotlauf Anlaß geben könnte. Die Klärung dieser Frage setzt eine gewissenhafte Keimisolierung und bakteriologische Diagnose voraus.

E. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zur Anreicherung des löslichen Antigens der serologischen Typen A, B und N von Erysipelothrix insidiosa beschrieben.

Mit Hilfe der Einengung durch Vacuumdestillation, Amonsulfatfällung, der Ultrafiltration und der Sephadexchromatographie konnte das lösliche Antigen gereinigt und seine Molekülgröße zwischen 45 000 und 2000 000 angenommen werden.

Der Ouchterlony-Test zeigte eine spezies-spezifische Reaktion des Antigens.

Zur Austestung diente der indirekte Hämagglutinationstest, der auf Grund der allgemeinen höheren Empfindlichkeit dem Widalschen Agglutinationstest und der direkten Präzipitation vorgezogen werden mußte.

Es konnte ein Titernachweis im menschlichen Serum erbracht werden, wobei allerdings der Vergleich zwischen dem indirekten Hämagglutinationstest und dem Widaltest kein eindeutiges Ergebnis zugunsten des indirekten Hämagglutinationstestes erbrachte.

F. LITERATUR

1. BECKMANN, I., LÜDERITZ, O. und WESTPHAL, O.:
Zur Immunalchemie der somatischen Antigene von Enterobacteraceae. IX. Serologische Typisierung von Salmonella R-Antigenen.
Biochem. Z. 339, 401 - 415 (1964)

2. BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology.
The Williams Wilkins Company, Baltimore (1957)

3. BOYDEN, S.W.:
The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein-sera.
J. Exp. Med. 93, 107 - 120 (1951)

4. BRILL, J., MIKULASZEK, G. and TRUSZCZYNSKI, M.:
Immunochemical studies on the antigen structures of Erysipelothrix rhusiopathiae
Zbl. Bakt. (Orig.) 175, 558 - 569 (1959)

5. DEDIĖ, K.:
Wirkung des säurelöslichen Antigens der Rotlaufbakterien im Tierversuch.
Zbl. Bakt. I.(Orig.) 158, 170 - 171 (1952)

6. DEDIĖ, K.:
Zur Differenzierung der Rotlaufbakterien nach ihren Eigenschaften in vitro.
Exp. Veterinärmed. 2, 56 - 66 (1950)

7. DETERMANN, H.:
Gelchromatographie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1967)

8. DINTER, Z.:
Über die haemagglutinative Aktivität des Rotlaufbakteriums.
Tierärztl. Umschau 3, 143 (1948)

9. ERLER, W.:
Studies of type-specific hapten of the Erysipelasbacteria

of the B-type.
Mh. Veterinaermed. 21, 109 - 110 (1966)

10. EWALD, F.W.:
Bakteriologie und Serologie humaner Rotlauferkrankungen unter besonderer Berücksichtigung des Ferrochlorid-Gelatinemediums nach KAUFFMANN.
Arb. a.d. Paul-Ehrlich-Institut, Hrsg. v. HEYMANN, G. Heft 61, 29 - 47 (1964)

11. GLEDHILL, A.W.
Passive protection of mice against infection with Erysipelothrix rhusiopathiae.
J. Comp. Path. a. Therap. 55, 93 - 108 (1945)

12. GLEDHILL, A.W.:
Some properties of a thermolabile antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae.
J. Gen. Microbil. 1, 211 - 219 (1947)

13. GLEDHILL, A.W.:
The immunonizing antigens of Erysipelothrix rhusiopathiae. The role of L-antigen.
J. Gen. Microbiol. 7, 179 - 191 (1952)

14. GRALHEER, H.:
Über ein spezifisch präzipitierendes Polysaccharid von Erysipelothrix rhusiopathiae.
Exp. Veterinärmed. 3, 65 - 68 (1951)

15. GRUMBACH-KIKUTH
Die Infektionskrankheiten des Menschen. Das Erysipeloid.
Thieme Verlag, Stuttgart, Band II. 936 - 943 (1958)

16. HAUPT, H.:
Medizinische bakteriologische Diagnostik. Erysipelothrix.
Enke-Verlag, Stuttgart, 233 - 236 (1964)

17. HAUSMANN, W.:
Weitere Entwicklungsarbeiten auf dem Gebiet der Rotlaufimpfstoffe. Folgerungen für die Impstoffbakteriologie im allgemeinen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 157, 83 - 86 (1951)

18. KALF, G.F. and WHITE, T.G.:
The antigenic components of Erysipelothrix rhusiopathiae. II. Purification and chemical characterization of a type-specific antigen.
Arch. Biochem. 100, 39 - 47 (1963)

19. KALF, G.F. et al.:
The antigenic components of Erysipelothrix rhusiopathiae. III. Purification of B- and C-antigens.
Arch. Biochem. 107, 141 - 146 (1964)

20. KOCH, R.:
Über die Wirkung der Oxalate auf den tierischen Organismus.
Arch. J. exper. Path. u. Pharmakol. Leipzig, XIV, 153 - 199 (1881)

21. LODENKÄMPER, H. und NICKEL, H.:
Über eine septisch verlaufende Rotlaufinfektion beim Menschen.
Ztschr. f. ges. inn. Med. 7, 277 - 279 (1952)

22. LOEFFLER, H.:
Experimentelle Untersuchungen über Schweine-Rotlauf, ausgeführt in der Zeit von Juli 1882 bis Dezember 1883 am Kaiserlichen Gesundheitsamte.
Arb. a.d.Kaiserl. Gesundheitsamte 1, 46 - 53 (1886)

23. MALONEY, E.D. and KAUFFMANN, H.E.:
The rapid and convenient detection of toxoplasma antibodies using formaldehyde treated human erythrocytes.
Amer. J. Ophthal. 50, 945 - 950 (1960)

24. MANNHEIM, W.:
Biochemische Differenzierung von Anaerobiern in "aeroben" bunten Reihen durch Mischkulturen mit Achromobacter metalcaligenes.
Zbl. Bakt. 187, 417 - 419 (1962)

25. MOHR, W.:
Handbuch der inneren Medizin
Springer Verlag, Heidelberg, 4.Auflage (1952)

26. NIKOLOV, P.:
Studies on the antigenic structure of Erysipelothrix rhusiopathiae.
Dol. Bolg. Akad. Nank. 15, 767 - 769 (1962)

27. PARK, H.K.:
Toxoplasma haemagglutination test for toxoplasma antibodies.
J. Clin. Path. 13, 331 -335 (1960)

28. PARNAS, J.:
Polysaccharides, serotypes and chemotypes in Parvobacteriaceae, Listeria, Erysipelothrix and Corynebacterium.
Z. Immunitaetsforsch. 130, 354 - 362 (1966)

29. PARNAS, J.:
Comparison of biotypes, serotypes, chemotypes and spectrophometric infrared types of Brucella, Klebsiella and Erysipelothrix.
Bull. Acad. Pol. Sci. (Biol.) 14, 475 - 481 (1966)

30. RICKMANN, H.:
Zur Frage der Identität der Erreger des Schweinerotlaufs, des Erysipeloids und der Mäuseseptikämie.
Z. Hyg. 64, 322 (1909)

31. ROSENBACH, F.J.:
Experimentelle, morphologische und klinische Studie über die krankheitserregenden Mikroorganismen des Schweinerotlaufs, des Erysipeloids und der Mäusesepsis.
Z. Hyg. 63, 343 - 359 (1909)

32. SCHMIDT, H.:
Fortschritte der Serologie
Verlag Dr. Steinkopf, Darmstadt (1955)

33. SCHMIDT, H.:
Die Konglutination. Das Komplement.
Verlag Dr. Steinkopf, Darmstadt (1959)

34. TRAUB, E.:
Immunisierung gegen Schweinerotlauf mit konzentrierten Adsorbatimpfstoffen.
Monatshefte f. Vet. Med. 2, 165 - 172 (1947)

35. TRUSZCZYNSKI, M.:
The antigenic structure of virulent and avirulent strains of Erysipelothrix rhusiopathiae.
I. Immunbiologic properties
Amer. J. Vet. Res. 22, 836 - 838 (1961)

36. TRUSZCZYNSKI, M.:
The antigenic structure of Erysipelothrix rhusiopathiae.
II. Immunochemic and serologic investigations.
Amer. J. Vet. Res. 22, 839 - 845 (1961)

37. TRUSZCZYNSKI, M.:
Immunological characterization of antigenic extracts obtained from bacteria with different methods.
II. Serotypes of Erysipelothrix insidiosa.
Arch. Immun. Ther. Exp. 11, 273 - 293 (1963)

38. TRUSZCZYNSKI, M.:
Immunochemical investigation on the antigenix extracts from various strains of Erysipelothrix insidiosa.
Acta Microbiol. Pol. 13, 179 - 186 (1964)

39. WAWRZKIEWICZ, K.:
Dissociation forms of Erysipelothrix insidiosa.
Acta Microbiol. Pol. 13, 45 - 54 (1964)

40. WHITE, T.G. and KALF, G.F.:
The antigenic components of Erysipelothrix rhusiopathiae.
I. Isolation and serological identification.
Arch. Biochem. 95, 458 - 463 (1961)

Herrn Professor Dr. med. R. SIEGERT, Direktor des Hygiene-Institutes der Universität Marburg/Lahn, danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dozent Dr. med. W. MANNHEIM danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die uneingeschränkte Förderung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 6. Dezember 1940 wurde ich, Ulrike Royé, geb. Bornefeld, als Tochter des Lehrers Wilhelm Bornefeld und seiner Ehefrau Berta, geb Schröter, in Osterode/Ostpreußen geboren. Nach einer vierjährigen Volksschulzeit besuchte ich das Goethe-Gymnasium in Dortmund und legte im Juli 1961 auf dem Realgymnasium Schloß Schwarzenberg in Scheinfeld/Mittelfranken die Reifeprüfung ab. Im Wintersemester 1961/62 begann ich mit dem Studium der Zahnheilkunde in Marburg a.d. Lahn, wo ich im April 1965 das zahnärztliche Physikum bestand. Meine klinischen Semester verbrachte ich in München und in Marburg. Im Februar 1968 bestand ich hier das Staatsexamen. Im März 1968 heiratete ich den Zahnarzt Dr. Klaus Royé. Aus der Ehe ging ein Kind hervor. Meine Assistentenzeit verbrachte ich in einer Zahnarztpraxis in Kiel. Seit Oktober 1969 bin ich in der Praxis meines Mannes in Kronberg/Taunus tätig.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Amon, Bücher, Bommer, Dimroth, Dölle, Gedigk, Hennis, Hering, Heuser, Hohorst, Janke, Karlson, Klingenberg, Korb, Lehmann-Grube, Mahr, Mann, Niemeyer, Niessing, Pantke, Petry, Pfütz, Rodeck, Rosemann, Sahlfeld, Schmid, Seidel, Siegert, Siess, Staib, Streicher, Strohmeyer, Vogt, Walcher

in München: Ascher, Büngeler, Borchers, Dontenwill, Eder, Fruhmann, Heiss, Ketterl, Lang, Linzenmeyer, Schauer, Schug-Kösters, Schwarz